

INTERES DIAGNOSTICO DE LA DOSIFICACION DE LAS
ISO-ENZIMAS DE LA DESHIDROGENASA LACTICA*

PROF. DR. J. WARTER**
P. METALLS
A. SACREZ

EL AUMENTO de ciertas actividades enzimáticas del suero es uno de los rasgos biológicos fundamentales de la citolisis. Este concepto justifica el enzimo-diagnóstico del infarto del miocardio, que se apoya sobre la determinación de varias enzimas y en especial de la transaminasa glutámico-oxalacética, de la difosfo-fructo-aldolasa, de la creatinina-quinasa y de la deshidrogenasa-láctica (D.H.L.), etc. Estas dosificaciones son sobre todo interesantes en casos particulares de necrosis del miocardio que tienen una evolución clínica atípica o un trazo electrocardiográfico de difícil interpretación. Pueden también llegar a ser indispensables para identificar algunas insuficiencias ventriculares no aclaradas, algunos síndromes coronarios latentes, algunos bloqueos de ramas, etc.

Hemos estudiado más en especial la D.H.L. por dos motivos principales: el primero biológico y el otro clínico. Vimos, en efecto, que en el curso de la dieta sin prótidos aplicada al ratón blanco, esta enzima se comporta de manera especial: mientras las otras actividades fermentales del miocardio disminuyen de acuerdo con el desperdicio nitrogenado, la D.H.L. tiende a conservar un nivel constante¹⁷.

En clínica, su dosificación nos parecía muy valiosa por constituir un test a la vez precoz y sensible. Su elevación en caso de infarto, se inicia entre la séptima y la doceava hora y se prolonga unos diez días. En este sentido su valor comparado con el de las transaminasas es seguro⁶.

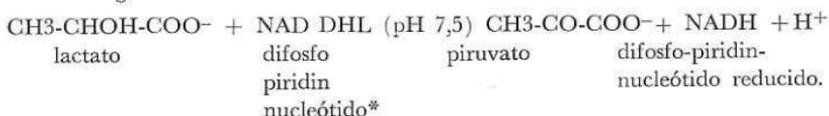
Desgraciadamente, este aumento de la D.H.L. carece de especificidad^{11, 20} porque se observa también en otros procesos citolíticos como en las hepatitis.

Es bien cierto que la D.H.L. es una enzima muy importante del metabolismo intermedio y por este mismo motivo en numerosos tejidos. Trabajos recientes no obstante han demostrado que la D.H.L. es una enzima constituida por un

* Trabajo leído en la sesión del 9 de octubre de 1963.

** De la Facultad de Medicina de Strasbourg, Francia. Clínica Médica,

cierto número de moléculas distintas. Todas tienen la facultad de catalisar la reacción siguiente:



pero se diferencian entre sí por sus estructuras primarias, su secuencia de aminoácidos¹⁸ y sus propiedades moleculares. Estas "isoenzimas" o "isozimas"^{14, 21} pueden ser individualizadas por sus propiedades, físico-químicas (electroforesis, cromatografía) y varios autores se han dedicado a estudiarlas mediante estos métodos a veces largos y complicados e intentaron establecer la especificidad de algún órgano.

Se puede pues pensar que lesiones destructivas de un tejido determinado descargan en el suero del enfermo una isoenzima de la D.H.L. característica. En realidad se ha demostrado la existencia de una isoenzima particular en las lesiones del miocardio, isoenzima distinta de la que se observa en la hepatitis, en los traumatismos musculares extensos¹² o en otras enfermedades con aumento de la D.H.L. sérica-global.

TÉCNICAS DE FRACCIONAMIENTO DE LAS ISOENZIMAS

Tres grupos de técnicas han sido empleados para fraccionar las isoenzimas del suero y de los tejidos de acuerdo con las propiedades fundamentales de la D.H.L.

A. *El fraccionamiento electroforético* de estas enzimas en varios medios y con pH= 8,5.

B. *La absorción* de estas fracciones sobre columnas de polisacaridos cambiadores de aniones: dietil-amino-etil-celulosa (DEAE-celulosa) o DEAE-sephadex.

C. *La termolabilidad* de algunas fracciones al calentamiento en condiciones determinadas o bien sea del suero o bien de los tejidos.

Vamos a ver ahora las ventajas y desventajas de estas distintas técnicas sin hablar de las investigaciones recientes sobre la inhibición selectiva de algunas D.H.L. isoenzimas¹⁶. Estos inhibidores parecen por lo demás actuar tanto sobre la solubilidad de ciertas proteínas que como verdaderos inhibidores.

A. FRACCIONAMIENTO ELECTROFORÉTICO

Estudiando la repartición de la D.H.L. en varios tejidos en el conejo o en varios órganos y en el suero humano, varios autores^{21, 2, 7, 8, 15} demuestran en 1959-60 la heterogeneidad electroforética de esta enzima.

* Se denomina hoy en día N.A.D. nicotinamida-adenin-dinucleótida la coenzima de óxido-reducción antiguamente llamada D.P.N.

Colocan el suero o el extracto tisular sobre un gel de gelosa de almidón o sobre una hoja de acetato de celulosa y practican una electroforesis en las mismas condiciones que para el fraccionamiento de las proteínas del suero. Después se demuestra la presencia de la enzima o de coenzimas a lo largo de la banda electroforética mediante distintos procedimientos.

Wieme¹⁹ fue uno de los primeros en proponer un método de diferenciación en esta forma: pone en contacto con el gel sobre el cual se hizo la migración electroforética, una capa de geles impregnada de substrato es decir, de lactato o de coenzima. Después se demuestra la actividad enzimática mediante la aparición de una banda de absorción luminosa en los 340 o 360 $m\mu$ (característica de la NADH) y que está proporcional a la actividad de la isoenzima. Se observan tantas manchas de absorción como hay fracciones en el medio estudiado. Este método largo y delicado necesita el empleo de un densitómetro con luz ultra-violeta. No obstante, proporcionó datos valiosos y ocasionó importantes mejoramientos técnicos.

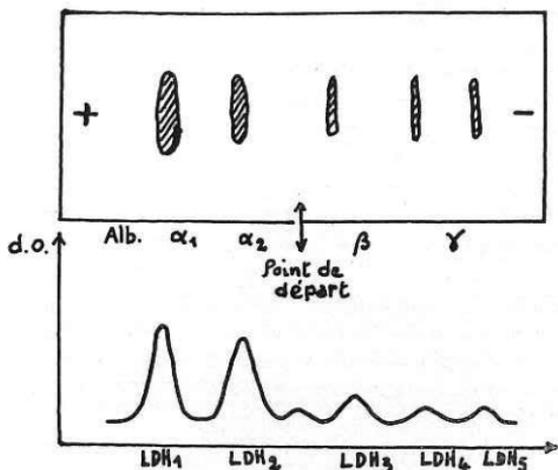
Van Der Helm¹⁴, Markert y Moller⁴, Tsao¹³ propusieron técnicas histoquímicas para revelar la actividad D.H.L. sobre el soporte.

Para ello utilizan lactato y NAD, y también sales de tetrazolium (Nitroblue tetrazolium) en presencia de phenazin methiosulfate, que dan una coloración rosa-café en las zonas de actividad. Este procedimiento relativamente sencillo da resultados parecidos al método anterior con la ventaja de una interpretación casi inmediata.

Estas dos técnicas demostraron la existencia de seis u ocho isoenzimas en el líquido celular de los órganos humanos.

En el suero solamente se encuentran 5 de estas fracciones.

La nomenclatura de estas iso-enzimas es relativamente complicada puesto que los autores europeos (Wieme, Dubach) emplean una numeración inversa de la que emplean los autores americanos (Wróblewski). Mantendremos en este trabajo la nomenclatura europea. La primera fracción (DHL1) migra a la misma velocidad que las α I globulinas, la segunda (DHL2) se coloca en frente de las α 2 globulinas la tercera (DHL3) en frente de las β globulinas, la cuarta (DHL4) en frente de las γ I globulinas y la quinta (DHL5) migra con las globulinas γ lentas (γ 2 globulinas). En el suero normal las dos primeras fracciones (DHL1 y DHL2) son casi siempre presentes y responsables de casi toda la acción DHL del suero. Las tres últimas son poco importantes y poco visibles sobre una cinta electroforética normal. Estas cinco fracciones se encuentran, cualquiera que sea el soporte utilizado para la electroforesis: gel de almidón^{15, 10, 8, 5}, acetato de celulosa⁷ o gel de gelosa^{14, 19}.



. Separación electroforética (sobre gelosa) de las iso-enzimas DHL del suero.

B. ABSORCIÓN SOBRE COLUMNA

La cromatografía sobre columna de DEAE-celulosa fue sobre todo utilizada por Hess y Walter². Como en la electroforesis, estos autores separan cinco fracciones DHL en el suero y demuestran que en el músculo cardíaco como en el hígado y los glóbulos rojos, la actividad principal se debe a una sola acción. La fracción "cardíaca" está fuertemente fijada sobre la columna; es la DHL I que migra con las α 1 globulinas.

De lo contrario la fracción principal del hígado que migra con las γ 2 globulinas (DHL 5) en la electroforesis, atraviesa rápidamente la columna.

Muy recientemente, Richterich y sus colaboradores⁹ han preferido al empleo de la DEAE-celulosa el empleo del Sephadex-DEAE. La separación de las iso-enzimas séricas y sobre todo tisulares absorbidos sobre columnas de esta resina, se realiza por una elusión a gradiente iónico. Así se separan 4 fracciones (α 1, α 2, β y γ).

Estas técnicas utilizando columnas y colectores de fracciones, fueron simplificadas en el uso corriente. Así Hess y Walter³ agregan suero, dializado anteriormente, una suspensión de DEAE-celulosa y después de 10 minutos de contacto y de centrifugación comprueban que solamente la fracción hepática (DHL 5) queda sobrenadando. Restando esta fracción de la actividad total del suero, tienen uno, aproximadamente, las otras iso-enzimas y en especial la iso-enzima cardíaca. (DHL 1).

Richterich⁹ acaba de proponer un método sencillo y rápido utilizando Sephadex-DEAE. Procede por absorción directa del suero (solo la fracción hepática no es absorbida) y después con elusiones sucesivas de la resina con soluciones buffer a pH=7,5 y conteniendo sucesivamente 50 mM, 100 mM, y después 300 mM de cloruro de sodio. Extrae así las β —, y después las α 2 y para terminar las α I iso-enzimas. También este autor comprueba mediante análisis de extractos tisulares que el músculo cardíaco contiene cerca de 80% de la fracción α I-isoenzima, mientras el hígado posee menos de 10% de esta fracción y más de 50% de la fracción γ iso-enzima. Los glóbulos rojos, el cerebro, el riñón, el páncreas, los músculos y el intestino tienen unas composiciones de aspecto intermedio (Cuadro 1).

CUADRO 1

REPARTICION DE LAS DHL-ISOENZIMAS EN LOS TEJIDOS HUMANOS (SEGUN RICHTERICH Y COL).⁹

Organo	Actividad DHL (μ M/min./g)	Repartición de las isoenzimas (%)			
		α_1 (DHL 1)	α_2 (DHL 2)	β (DHL 3)	γ (DHL 4-5)
Músculo cardíaco (ventrículos)	91	82	5	3	10
Glóbulos rojos	40	58	28	8	6
Cerebro	54	65	11	9	15
Riñón	175	49	23	13	15
Páncreas	35	24	24	24	28
Músculo estriado	82	17	13	22	48
Mucosa intestinal	24	18	21	26	35
Hígado	103	6	11	27	56

C. TERMOLABILIDAD

Plagemann y colaboradores⁸ fueron los primeros en ver la diferencia de termoeestabilidad entre distintas iso-enzimas de la DHL purificadas por electroforesis. Este fenómeno estudiado después por Wroblewski y Gregory²¹ permite separar las iso-enzimas en tres grupos. Estos autores comprueban por fin que después de agregados sueros sin isoenzimas, la fracción DHL⁵ (fracción hepática) se encuentra completamente destruída a 57°C después de 30 minutos mientras la DHL¹ (fracción cardíaca) resiste a esta temperatura y hasta los 65°C. Los resultados son aún más nítidos, si se toma el cuidado de agregar al suero NADH antes del calentamiento. Es este estudio sencillo de determinación diferencial de los tres grupos de iso-enzimas que empleamos corrientemente en nuestro laboratorio. A 2 ml. de suero se agrega 0,2 ml. de solución de NADH (2,5 mg/ml) y después de 20 minutos aproximadamente, se distribuye este suero sobre

3 tubos de ensaye. La primera parte sirve para la determinación de la DHL total mediante el método espectro-fotométrico.

El segundo tubo está colocado durante 30 minutos exactamente en un baño-maría de 57°C. agitándolo rápidamente y continuamente. El tercer tubo está colocado en las mismas condiciones pero a una temperatura de 65°C. Sobre los dos sueros calentados, se determina la actividad DHL que queda. El interés de este método rápido ha sido confirmado por Wust²³, por Dubach¹, por Strandjord¹². Estos autores aconsejan para el diagnóstico de los infartos del miocardio determinar la DHL¹, gracias a su resistencia al calentamiento durante 30 minutos a 65°C.

RESULTADOS

Cualquiera que sea la técnica utilizada, la determinación del porcentaje de cada fracción isoenzimática de un suero dado difiere poco según los autores.

CUADRO 2

REPARTICION DE LAS DHL-ISOENZIMAS DE UN SUERO NORMAL DETERMINADAS SEGUN DISTINTAS TECNICAS

Terminología europea: — americana: — electroforética:	Repartición de las isoenzimas (%)				
	DHL 1 DHL 5 α_1	DHL 2 DHL 4 α_2	DHL 3 DHL 3 β	DHL 4 DHL 2 γ_1	DHL 5 DHL 1 γ_2
Técnicas: Electroforesis: Densitometría U. V. Colorimetría con tetrazolium .	18-29 35	37-57 50	14-23 15	2-12 huellas	0-6 huellas
Absorción: Hess y Walter	fracciones absorbidas más o menos 60%			fracciones no absorbidas más o menos 38%	
Termoestabilidad: Wroblewski y Gregory	estables a 65°: 20-40%		lábilés a 65° estables a 57° 35 a 55 %		lábil a 57°: 10-30%
Dubach-Strandjord	estable a 65°: 45 o men 25%		lábilés a 65°: más o menos 75%		
Origen	miocardio globulos rojos			hígado músculo estriado	

El cuadro Núm. 2 resume la repartición de las iso-enzimas de la DHL en el suero normal avaluados por distintos métodos de aislamiento (electroforesis, absorción, termolabilidad). Se hace notar que la DHL 5 de los autores europeos

(o DHL I de los autores americanos) tiene como característica de migrar con las γ -globulinas lentas, de no ser absorbida sobre la DEAE-celulosa y de ser muy lábil al calor. Esta porción se encuentra prácticamente inexistente en el suero

CUADRO 3

ISOENZIMAS DE LA DHL EN EL CURSO DEL INFARTO DEL MIOCARDIO. AUMENTO CONSTANTE DE LA DHL TOTAL INTERESANDO SOBRE TODO LA FRACCIÓN DE ISOENZIMAS ESTABLES A 65°

Nombres	Diagnóstico	DHL total	DHL estable a 65° C	DHL inestable a 65° C	DHL % estable a 65° C
MET.	Infarto del miocardio 7o. día. Extrasistolia ventricular	750	512	238	68%
THO.	Infarto del miocardio. Embolia del carrefour aórtico. Muerte.	2125	1725	400	81%
VEI	Infarto del miocardio post-terolateral. Muerte.	750	500	250	67%
DUR.	Infarto de miocardio. 2 días después del ataque. 4 días después del ataque. 7 días después del ataque.	2640 1700 925	2200 1250 780	440 450 145	83% 74% 84%
SEY.	Infarto del miocardio. Disociación aurículo-ventricular.	1085	850	235	78%
BLU.	Infarto del miocardio. Embolia arterial femoral izquierda.	1300	800	500	62%
LET.	Infarto posterior del miocardio. 3er. día. Infarto antiguo (1960) Asistolia.	975	900	75	92%
KLE.	Infarto antero-septal 4o. día. Asistolia.	1035	625	410	51%
PET.	Infarto reciente del miocardio. Asistolia. Flebitis y embolia pulmonar. Muerte.	1235	900	335	81%
MUT.	Infarto del miocardio antero-lateral. 2 días después de la crisis. Muerte.	5200	2700	2500	52%
KAY.	Infarto posterior del miocardio. 3er. día. 10o. día.	1560 675	850 425	710 250	54% 63%
WAL.	Infarto anterior del miocardio. 12o. día. Arteritis de miembros inferiores.	600	350	250	58%
BLU.	Infarto posterior del miocardio. 8o. día.	700	650	50	93%

normal, se encuentra en el hígado y el músculo, a tal grado que su aumento en el suero se encuentra sobre todo en las hepatitis agudas, infecciosas o tóxicas. Al contrario, la DHL I de los autores europeos, (o DHL5 de los americanos) migra con las α I globulinas, está absorbido por la DEA-celulosa y resiste al calentamiento. Representa la fracción más importante del suero normal y su elevación se encuentra en las necrosis miocárdicas.

Entre estas dos fracciones extremas las tres fracciones intermedias se encuentran menos bien definidas. La DHL 2 (α 2-isoenzima) que existe en los glóbulos rojos se encuentra en el suero normal casi en la misma cantidad como la DHL I. Las variaciones patológicas de estas dos isoenzimas se hacen muy a menudo en forma paralela. La DHL2 está absorbida sobre la DEAE-celulosa pero está casi completamente destruída por el calentamiento a 50°C., y no resiste a 30 minutos de calentamiento a 65°C.

Las iso-enzimas DHL 3 y DHL 4 son mal conocidas.

Algunos autores se han empeñado en determinar las variaciones de todas estas fracciones en estados patológicos, *pero está admitido que para el estudio de la necrosis del miocardio solamente la determinación de la fracción estable*

CUADRO 4

ISOENZIMAS DE LA DHL EN ENFERMEDADES CARDIACAS QUE NO SEAN INFARTOS RECIENTES. LA DHL TOTAL ES NORMAL SALVO EN LOS CASOS CHE. Y WEI., PERO EL PORCENTAJE DE DHL ESTABLE A 65° QUEDA NITIDAMENTE POR DEBAJO DEL 50% EN TODOS LOS CASOS

Nombres	Diagnóstico	DHL total	DHL estable a 65° C	DHL inestable a 65° C	DHL % estable a 65° C
LEH.	Antiguo infarto del miocardio póstero-lateral. Ataques anginosos	550	100	450	18%
HUM.	Antiguo infarto del miocardio.	300	30	270	10%
BUH.	Antiguo infarto del miocardio. Bloqueo de rama izquierda. Infarto pulmonar.	175	80	95	46%
STA.	Bloqueo de rama izquierda. Insuficiencia ventricular izquierda por hipertensión arterial.	310	123	187	40%
GRO.	Insuficiencia ventricular izquierda. Hipertensión arterial.	550	175	375	32%
SEC.	Cor pulmonale crónico.	350	60	290	17%
CHE.	Miocarditis de etiología indeterminada. Muerte.	1200	165	1135	14%
WEI.	Asistolia por enfermedad mitral.	835	175	660	21%

a 65° presenta un particular interés. El método de diferenciación por el calor, sencillo y rápido permite demostrar la elevación constante de la DHL sérica después de un infarto del miocardio se debe a la elevación de la fracción termestable mientras en caso de hepatitis, se debe a la fracción inestable.

Con este método hemos estudiado la DHL en el suero de 13 enfermos padeciendo infarto del miocardio (Cuadro 3). Como ya lo habíamos comprobado⁶, la actividad global de la DHL se encuentra en todos los casos más elevada que lo normal, es decir por debajo de 400 U.W. A veces llega a cifras muy elevadas y queda en niveles francamente patológicos y significativos durante más de 10 días después de iniciarse la lesión del miocardio. El fraccionamiento de las iso-enzimas con el test al calor nos enseña que este aumento se hace sobre todo en la fracción estable a 65°C que representa más del 50% y llega hasta el 90% de la totalidad de la DHL. Esta repartición persiste durante todo el

CUADRO 5

EN LAS HEPATITIS AGUDAS, AUMENTO DE LA DHL TOTAL INTERESANDO SOBRE TODO LA FRACCION DE ISOENZIMAS DESTRUIDAS A 65° C.

EN LAS ICTERICIAS POR OBSTRUCCION, DHL TOTAL Y REPARTICION DE ISOENZIMAS NORMALES

Nombres	Diagnóstico	DHL total	DHL estable a 65° C	DHL inestable a 65° C	DHL % estable a 65° C
LAI.	Hepatitis icterica aguda.	800	175	625	22%
PFA.	Hepatitis aguda y enfermedad mitral.	675	70	605	10%
CLA.	Hepatitis icterica aguda.	835	60	775	7%
GUY.	Hepatitis icterica aguda.	875	150	725	17%
KER.	Hepatitis catarral.	1300	150	1150	11%
RUS.	Hepatitis prolongada 8a. semana.	1050	150	900	14%
HAA.	Hepatitis aguda en el curso de una diabetes acidocica.	750	200	550	27%
RID.	Hepatitis prolongada 10a. semana.	1040	0	1040	0%
WER.	Litiasis de vias biliares. Ictericia por obstruccion extra-hepatica.	250	95	155	38%
RIB.	Litiasis del colodoco. Ictericia por obstruccion extra-hepatica.	540	60	480	11%
ETT.	Litiasis del colodoco. Ictericia por obstruccion extra-hepatica.	175	40	135	22%

aumento de la actividad de la DHL. Este hecho, constante, es una de las mejores pruebas patológicas de la necrosis del miocardio. No hemos encontrado estos datos en enfermedades simulando un infarto del miocardio (Cuadro 4). En la mayoría de los casos, la determinación de la actividad global de la DHL da resultados normales y en los casos en los cuales no lo es, la separación de las iso-enzimas mediante el calor permite afirmar que no se trata de necrosis del miocardio, (caso CHE... y WEI...). La elevación total de la DHL se debe entonces a otros factores de necrosis (hígado, músculo o sangre).

El problema del diagnóstico diferencial de las ictericias por obstrucción o por hepatitis ya estaba resuelto mediante la determinación de la actividad global de la DHL: actividad muy aumentada en la hepatitis, normal en caso de obstrucción. Pero la separación mediante el calor permite afirmar que en la ictericia por retención el estado enzimático se encuentra normal y de ver que en

CUADRO 6

ENFERMEDADES DIVERSAS PROVOCANDO UN AUMENTO DE LA DHL TOTAL, MIENTRAS LA FRACCIÓN DE DHL ESTABLE A 65° QUEDA NORMAL.

Nombres	Diagnóstico	DHL total	DHL estable a 65° C	DHL inestable a 65° C	DHL % estable a 65° C
BOU.	Leucemia linfoide.	425	50	375	12%
MAT.	Leucemia mielóide.	1100	100	1000	9%
VOG.	Cáncer gástrico con metástasis óseas.	2000	575	1425	29%
FER.	Cáncer pancreático con metástasis pulmonares y pleurales.	1050	180	870	17%
HEI.	Cáncer pancreático con carcinomatosis peritoneal.	4300	150	4150	3,5%
GRO.	Anemia de Biermer.	4500	100	4400	2,2%
ILT.	Mononucleosis infecciosa.	625	150	475	24%
BRI.	Embolia pulmonar con infarto pulmonar.	925	100	825	11%

los casos de hepatitis, el aumento global de la DHL se debe a un aumento de la fracción termoinestable (Cuadro 5). Existe, pues, una oposición clara entre la DHL de origen cardíaco y la de origen hepático puesto que, lo repetimos, la DHL de origen miocárdica es termoestable.

Este método tiene, no obstante, sus limitaciones. Se sabe que en casos de cáncer o de alteración de los glóbulos rojos (anemia de Biermer, etc.), o de los glóbulos blancos (leucosis), la DHL total está muy elevada. Este aumento se

debe a una fracción termo-inestable (Cuadro 6). Aquí también el test del calor permite diferenciar la isoenzima de origen cardíaco de las otras, pero, para diferenciar ésta entre sí y saber si son de origen sanguíneo, muscular o hepático, es necesario recurrir a métodos más completos como la electroforesis o la cromatografía de absorción.

El test de separación mediante el calentamiento a 65°C tiene la ventaja de aislar la DHL de origen cardíaco y constituye un test específico en el diagnóstico biológico del infarto del miocardio. Es un método sencillo que se presta bien a ser puesto en práctica.

CONCLUSIÓN

Dentro de las alteraciones enzimáticas del suero en las lesiones necróticas de varios tejidos, la elevación de la DHL ocupa un lugar muy importante sobre todo desde que se ha descubierto la heterogeneidad de esta enzima. Mediante la electroforesis y la cromatografía de absorción se pudo fraccionar en varias iso-enzimas que se modifican distintamente según los órganos lesionados. Esto puede servir para hacer el diagnóstico del órgano lesionado.

En la práctica corriente, un estudio de laboratorio permite aislar una fracción enzimática estable al calentamiento a los 65°C y una fracción inestable. El hecho de comprobar que la fracción termoestable constituye más del 50% de la totalidad de la DHL en caso de infarto del miocardio hace de este estudio un exámen específico. Por el contrario, en la fracción inestable a los 65°C se encuentran varias iso-enzimas y en especial las de origen hepático y sanguíneo. Estas últimas deben ser determinadas mediante técnicas más complicadas.

BIBLIOGRAFÍA

1. U. C. Dubach: Organspezifische Diagnose mit Hilfe von Isoenzyme der Serum-Lactatdehydrogenase. *Schweiz. Med. Wochr.*, 1962, 92, 1436-1454.
2. B. Hess et S. J. Walter: Über des Protein der Laktatdehydrogenase in menschlichen Serum und Gewebe. *Klin. Wochenschr.*, 1960, 38, 1080-1088.
3. B. Hess et S. J. Walter: Absorptions-Methode zur Differenzierung der Laktatdehydrogenase sowie anderer löslicher Fermente und Proteine in Serum und Gewebe. *Klin. Wochenschr.*, 1961, 39, 213-216.
4. C. L. Markert et F. Moller: Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic and species specific patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 1959, 45, 753-763.
5. C. L. Markert et E. Appela: Physicochemical properties of purified isozymes of lactate-dehydrogenase from different sources. *Fed. Proc.*, 1962, 21, 253.
6. P. Metais et A. Sacrez: La lactico-déshydrogénase sérique dans les affections cardiaques. *Strasbourg-Méd.*, 1963, 518-527.
7. G. Pfeleiderer et E. G. Wachsmuth: Alters- und funktionsabhängige Differenzierung der Laktatdehydrogenase menschlicher Organe. *Biochem. Zeitsch.*, 1961, 334, 185-198.
8. P. G. W. Plagemann, K. F. Gregory et F. Wroblewski: The electrophoretically distinct forms of mammalian lactic dehydrogenase. II. Properties and interrelationships of rabbit and human lactic dehydrogenase isozymes. *J. Biol. Chem.*, 1960, 235, 2288-2293.

9. R. Richterich, P. Schafroth et H. Aebi: A study of lactic-dehydrogenase isoenzyme upattern of human tissues by adsorption-elution on Sephadex-DEAE. *Clin. Chim. Acta*, 1963, 8, 178-192.
10. R. Richterich, J. Locher, K. Zuppinger et E. Rossi: Die Differentialdiagnose maligner und benigner Ergüsse durch Bestimmung der Laktatdehydrogenase isoenzyme. *Schweiz. Med. Wochenschr.*, 1962, 92, 919-927.
11. T. W. Stewart et F. G. Warburton: Serum lactic-dehydrogenase estimations in myocardial infarction. *Brit. Heart J.*, 1961, 23, 236-242.
12. P. E. Strandjord, K. J. Clayton et E. F. Freier: Heat stable lactatedehydrogenase in the diagnosis of myocardial infarction. *J.A.M.A.*, 1962, 182, 1099-1102.
13. M. V. Tsao: Heterogeneity of tissue dehydrogenases. *Arch. Biochem. Biophys.* 1960, 90, 234-238.
14. H. J. Van der Helm: Simple Method of demonstrating lactic acid-dehydrogenase isozymes *Lancet*, 1961, 2, 108-109.
A simplified method of demonstrating lactic dehydrogenase isoenzymes in serum. *Clin. Chim. Acta*, 1962, 7, 124.
15. E. S. Vessell et A. G. Bearn: The heterogeneity of lactic and malic dehydrogenase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1958, 75 (1), 286-291.
Isozymes of lactic-dehydrogenase in human tissues. *J. Clin. Invest.*, 1961, 40, 586-591.
16. F. G. Warburton, D. Smith et G. S. Laing: Inhibition of lactic-dehydrogenase isoenzymes. *Nature*, 1963, 198, 386-387.
17. J. Warter, P. Metais et M. Keckhut: Transaminases, aldolase et déshydrogénases du sérum, du foie et du coeur au cours du jeûne protidique chez la rat. *C. R. Soc. Biol.* 1961, CLV, 108-111.
18. T. Wieland et G. Pfeleiderer: Nachweis der Heterogenität von Milchsäuredehydrogenasen verschiedenen Ursprungs durch Trägerelectrophorese. *Biochem. Zeitsch.*, 1957, 329, 112-116.
19. R. J. Wieme: Sur la multiplicité de la lactico-dehydrogénase sérique chez l'homme. Behringwerk-Mitteilungen 1958, 34, 223. Colloque sur les enzymes en chimie clinique. Gand, Ed. Arscia, Bruxelles, 1960, p. 99-108.
20. L. P. White: Serum enzymes. I. Serum lactic-dehydrogenase in myocardial infarction. *New. Engl. J. Med.*, 1956, 255, 984-988.
21. F. Wróblewski, C. Ross et K. Gregory: Isoenzymes and myocardial infarction. *New Engl. J. Med.*, 1960, 263, 531-536.
22. F. Wróblewski et K. Gregory: Lactic-dehydrogenase isozymes and their distribution in normal tissues and plasma and in disease states. *Ann. N. Y. Acad. of Sci.*, 1961, 94, 912-932.
23. H. Wust: Thermische Inaktivierung von Serum und Organfermenten. *Symposium on multiple molecular forms of enzymes and their use in clinical diagnosis*. Gand, 27 avril 1963, résumé des communications p. 151.